Estudios meióticos en dos especies de crisópidos (Chrysopidae: Neuroptera)

Andrada, A. R.; M. E. Lozzia; E. González-Olazo; F. Heredia
Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina, rubenfml@yahoo.com.ar.

➤ **Resumen** — Se analizó la espermatogénesis de dos especies del género *Chrysoperla, C. argentina* y *C. externa,* consideradas biocontroladoras de numerosas plagas agrícolas, en base a estudios citológicos. Se caracterizan por poseer un sistema simple de determinación sexual XY (n = 5A + XY). Los cromosomas sexuales presentan heteropicnosis positiva en profase temprana y una segregación a distancia en estadios más avanzados. Un análisis comparativo entre las dos especies muestra un comportamiento citológico similar al de otros neurópteros.

Palabras clave: Neuroptera, segregación a distancia, citología, sistema sexual.

➤ **Abstract** — "Meiotic studies in two species of chrysopids (Chrysopidae: Neuroptera)". The spermatogenesis of two chrysopids, *Chrysoperla argentina* and *C. Externa*, used as biological controls of numerous agricultural plagues, was analyzed based on cytological studies. They are characterized by a simple system of sex determination XY (n = 5A + XY). The sexual chromosomes show positive heteropicnosis during early prophases and distance segregation in latter stages. The comparative analysis performed between the two species show similar cytological behavior to other neuropterous insects.

Key words: Neuroptera, distance segregation, cytology, sexual system.

INTRODUCCIÓN

Los representantes del orden Neuroptera son importantes como biocontroladores de plagas agrícolas (Botto, 1999; González-Olazo y Reguilón, 1999). Desde el punto de vista genético y evolutivo resultan muy interesantes porque en sus diversas familias se registraron los siguientes fenómenos: segregación aquiasmática, segregación a distancia, cromosomas B, múltiples sistemas de determinación del sexo, fusión y fisión de cromosomas (Oguma y Asana, 1932; Kichijo, 1934; Asana y Kichijo, 1936; Hughes-Schrader, 1969; Nokkala, 1986a; Andrada *et al.*, 2011).

En Neuroptera, se reportó la presencia del mecanismo «segregación aquiasmática» (o meiosis aquiasmática), suceso mediante el cual cromosomas no homólogos, por ejemplo cromosomas sexuales, se presentan disyuntos (carentes de quiasmas) durante la primera división meiótica y permanecen como univalentes desde comienzos del diplotene hasta finalizar la anafase I (AI) (Nokkala y Nokkala, 2004). La segregación aquiasmática con frecuencia conlleva en Neuroptera a una «segregación a distancia». Este fenómeno está asociado a la falta de homología de los cromosomas y se caracteriza por la disyunción y migración temprana de los cromosomas hacia las regiones polares, quedando sus pares autosómicos ubicados aún en la placa ecuatorial durante la metafase I (MI) o metafase II (MII) (Oguma y Asana, 1932; Asana y Kichijo, 1936; Hughes-Schrader, 1969; Nokkala, 1986a,1986b). La segregación a distancia puede ocurrir en los cromosomas sexuales durante la meiosis I, por ejemplo, en Neuroptera, Coleoptera y crustáceos (Niiyama, 1959; Nokkala, 1986a; Virkki y Santiago-Blay, 1993) o en meiosis II de hemípteros (Kuznetsova *et al.*, 2004).

En Neuroptera es destacable la predominancia del sistema XY/XX, siendo generalmente el cromosoma Y el más pequeño entre

Recibido: 09/04/12 – Aceptado: 27/07/12

los cromosomas sexuales heteromórficos (Asana y Kichijo, 1936; Hughes-Schrader, 1969; Andrada *et al.*, 2011). Se conoce que este sistema puede tener variantes de tipo X0/XX, macho/hembra respectivamente en *Climacia areolaris* (Hagen); X0 en machos de *Ululodes vetula* (Rambur); X_1X_2Y en machos de *Myrmeleon mexicanum* Banks; $X_1X_2Y_1Y_2$ en machos de *Brachynemurus hubbardi* Currie; y $X_1X_2X_3Y_1Y_2Y_3$/ $2X_12X_22X_3$ en *Entanoneura phthisica* (Gerstaecker), macho/hembra respectivamente (Hughes-Schrader, 1969, 1975, 1983; Andrada *et al.*, 2011).

El trabajo más amplio llevado a cabo en la familia Chrysopidae es el de Séméria (1984), quien efectuó estudios referentes a la morfología externa e interna, desarrollo, ecología y citogenética de estos insectos, citando como número básico 2n = 12, con variantes 2n = 10 y 2n = 14 (descriptas por Hirai, 1957), debido a fenómenos de fusión o fisión de cromosomas.

Dentro del orden Neuroptera, las familias Chrysopidae y Hemerobiidae son las más utilizadas como control biológico de plagas agrícolas, lo que inspiró recientemente a la realización de estudios moleculares en la familia Chrysopidae (Morales y Freita, 2004; Cadena *et al.*, 2007).

En este trabajo se realiza el análisis comparativo de la meiosis de poblaciones naturales, en machos de dos especies del género *Chrysoperla*: *C. argentina* (González Olazo y Reguilón, 2002) y *C. externa* (Hagen), insectos de indudable importancia económica, para profundizar el conocimiento citogenético preliminar de estas especies (Andrada *et al.*, 2009, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 7 ejemplares de cada especie. El material estudiado y las localidades de recolección se detallan a continuación: *Chrysoperla argentina*, 15/4/2006, Dpto. Leales, Prov. Tucumán, Argentina; *Chrysoperla externa,* 8/3/2007, Dpto. Burruyacú, Prov. Tucumán, Argentina.

Los ejemplares se fijaron en alcohol 96º (Nowacek, 2010) y se conservaron a temperatura ambiente. Los testículos se obtuvieron mediante la disección entre el sexto y séptimo segmento del abdomen. Previo a la tinción, se efectuó una hidrólisis con HCl 1N a 60 ºC, debido al endurecimiento que experimentan los tejidos por la fijación. El tiempo de duración de la hidrólisis depende de la antigüedad del material: tres minutos en testículos de ejemplares recién colectados; cinco minutos cuando el material tiene más de un año. La coloración y el montaje se realizaron en una gota de hematoxilina propiónica 2 %.

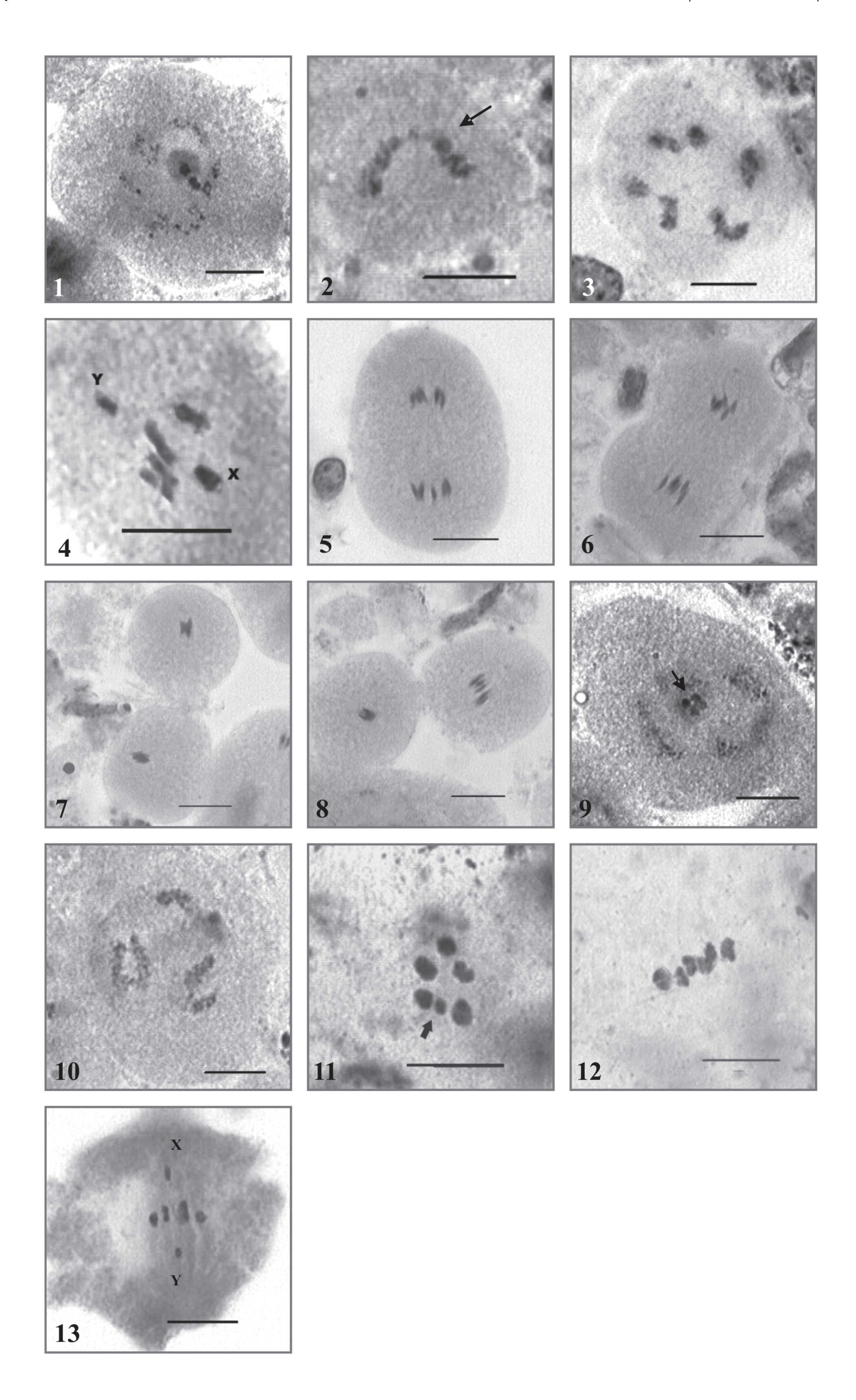
Las microfotografías se tomaron con una cámara Moticam 1000 (1.3MP) conectada a un microscopio Nikon Eclipse E200.

RESULTADOS

Chrysoperla argentina posee (siguiendo la nomenclatura utilizada por Nokkala, 1986b, 1986c; Nokkala y Nokkala 1986) un sistema simple de determinación del sexo XY (n = 5A + XY). Se observaron células que presentan aspecto difuso, similares al estadio descripto por Nokkala y Nokkala (1983, 1986) y Nokkala (1986b, 1986c), en diferentes sub-estadios: células con aspecto de interfase que presentan la cromatina descondensada y un par de cuerpos con heteropicnosis positiva, que corresponderían al par sexual (Fig. 1). Posteriormente se comienza a visualizar un único cuerpo cromatínico a modo de bivalente de gran tamaño (Fig. 2).

Las diacinesis muestran la formación de 6 «bivalentes» de aspecto granular, sin que se pueda establecer cuál corresponde a los cromosomas sexuales (Fig. 3). Las metafases I presentan cromosomas sexuales con segregación a distancia (Fig. 4). Los cromosomas sexuales son los primeros en migrar hacia los polos y posteriormente son alcanzados por los autosomas en AI, adquiriendo el aspecto típico de una anafase (Fig. 5). Al finalizar la telofase I (TI), las células se dividen para dar lugar a dos células hijas listas para comenzar la segunda división meiótica (Figs. 6-8).

Chrysoperla externa también posee un sistema simple de determinación sexual XY (n


1
2
3
Y
X
4
5
6
7
8
9
10
11
12
X
Y
13

Figs. 1-8: *Chrysoperla argentina*. **1)** Estadio difuso con cromosomas sexuales heteropicnóticos positivos. **2)** Estadio difuso con cromatina condensada en un cuerpo a modo de bivalente. **3)** Diacinesis: n = 5A + XY. **4)** Metafase I con segregación a distancia de los cromosomas sexuales. **5)** Anafase I media. **6)** Anafase I tardía. **7)** Telofase I. **8)** Dos células producto de la primera división meiótica, la célula de la derecha se encuentra en Metafase II.
Figs. 9-13. *Chrysoperla externa*. **9)** Estadio difuso con cromosomas sexuales heteropicnóticos positivos y bipartitos, la flecha indica el cromosoma con tinción más intensa. **10)** Estadio difuso con 3 cuerpos a modo de bivalente. **11)** Prometafase tardía en vista polar con n = 5A + XY, el par sexual señalado con flecha. **12)** Prometafase tardía en vista ecuatorial. **13)** Metafase I con segregación a distancia. Escala = 10 µm.

= 5A + XY). De igual modo que en el caso anterior, se observaron células en estadios difusos en diferentes sub-estadios: la cromatina se descondensa y adquiere el aspecto de estar en interfase, con dos cuerpos heteropicnóticos positivos bien evidentes con configuración bipartita, uno de ellos con una tinción bastante más intensa (Fig. 9). En un sub-estadio más avanzado, las células pueden presentar tres cuerpos a modo de bivalentes (Fig. 10). A partir de la prometafase avanzada, tanto los autosomas como los cromosomas sexuales son isopicnóticos, con 6 «bivalentes» evidentes, uno de ellos notablemente más pequeño que correspondería al par sexual (Figs. 11 y 12). Las MI exhiben segregación a distancia (Fig. 13).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El número básico propuesto para la familia es 2n = 12 (Séméria, 1984). Nuestras observaciones confirman este número diploide. Séméria (1984) también menciona que hasta esa fecha, tan solo 24 especies pertenecientes a Chrysopidae fueron estudiadas citogenéticamente, un porcentaje ínfimo si consideramos que para la familia fueron descriptas alrededor de 1300 especies (Valencia-Luna *et al.*, 2006). Recientemente se han añadido recuentos cromosómicos para 7 especies de Chrysopidae: en *Ceraeochrysa paraguaria* (Navás) n = 5A + XY, *Ceraeochrysa caligata* (Banks) [=*Ceraeochrysa cornuta* Navas] y *Ceraeochrysa cincta* (Schneider) con 2n = 10 + XX/XY (♀/♂ respectivamente); *Chrysopodes delicata* (Freitas y Penny) posee 2n = 6 y es el número más bajo registrado en Neuroptera (Andrada *et al.*, 2011; Lopes y Freitas, 2011, 2012); finalmente los recuentos efectuados en *Chrysoperla argentina*, *C. externa* y *C. defreitasi*, donde se reportaron 2n = 10 + XX/XY (♀/♂ respectivamente) en células somáticas y n = 5A + XY en espermatocitos primarios (Hermanson y Freitas, 2004; Andrada *et al.*, 2009, 2011), observaciones que se confirman con nuestros recuentos meióticos para ambas especies estudiadas en este trabajo.

Aunque la familia Chrysopidae es cosmopolita, la gran mayoría de la información citogenética que se conoce se limitan a ejemplares recolectados en Europa y Japón, siendo los trabajos de Andrada *et al.* (2009, 2011), Hermanson y Freitas (2004) y de Lopes y Freitas (2011, 2012) para Argentina y Brasil, los primeros análisis citogenéticos llevados a cabo para los crisópidos sudamericanos.

La característica de los Neuroptera de poseer cromosomas sexuales de menor tamaño, su cromosoma Y siendo el más pequeño del par sexual heteromórfico (Hughes-Schrader, 1969; Séméria, 1984), fue posible observar en las MI de ambas especies estudiadas. La migración precoz de los cromosomas sexuales en MI de Chrysopidae ya se menciona en los trabajos de Hirai (1957) y a través de nuestras investigaciones quedó confirmada la segregación a distancia en estas dos especies. Otras familias de Neuroptera que exhiben este tipo de segregación son Ascalaphidae, Hemerobidae, Mantispidae y Myrmeleontidae (=Myrmeleonidae) (Oguma y Asana, 1932; Hughes-Schrader, 1969; Nokkala, 1986a, Andrada *et al.*, 2011), lo que sugeriría que este fenómeno pudo haber surgido tempranamente en la historia evolutiva del orden.

Se ha propuesto que la segregación a distancia surge debido a una asinapsis o desinapsis de los cromosomas sexuales en estadios muy tempranos de la división I (Hughes-Schrader, 1969; Nokkala, 1986a). Hughes-Schrader (1969) considera que cuando se produce una desinapsis, los quiasmas ocurren sólo cuando los cromosomas sexuales son heteropicnóticos positivos, en cigotene-paquitene, y posteriormente estos cromosomas permanecen como univalentes hasta el final de la división I. En la presente investigación se pudo observar que los cromosomas sexuales de *C. argentina* y *C. externa* permanecen con algún tipo de contacto físico más allá de paquitene y adquieren la configuración de 6 «bivalentes», aunque no se ha logrado establecer si existen quiasmas entre ellos. Además, los cromosomas sexuales de *C. externa* se ubican en la placa ecuatorial junto con los autosomas, antes de su separación precoz (Figs. 11 y 12), fenómeno que fue reportado por Nokkala (1986b) para la familia Hemerbiidae. Tales cromosomas se presentan como univalentes sólo después de separarse de la placa ecuatorial, cuando se produce la segregación a distancia.

Se conoce que en mantis, lepidópteros y mecópteros, puede existir retención de contacto físico entre cromosomas aquiasmáticos más allá de la profase, debido a la acción de restos del complejo sinaptonémico (Nokkala y Nokkala, 1983). Cabe la posibilidad de que este mecanismo sea el responsable de la «no disyunción» durante la profase de los cromosomas sexuales en *C. argentina* y *C. externa*.

A medida que transcurre el estadio difuso, la condensación de los cromosomas parece ser asincrónica en ambas especies estudiadas, donde las células presentan cuerpos con forma de bivalentes, que incrementan su número a medida que avanza el estadio difuso (Figs. 1, 2, 9 y 10).

La alociclia de los cromosomas sexuales es bastante común entre los insectos y se ha observado por ejemplo en meiosis de Odonata (Mola, 1995), en Hemiptera (Nokkala y Grozeva, 2000; Ruíz de Bigliardo *et al.*, 2011), y en Ortoptera (Ruíz de Bigliardo *et al.*, 2007). Este fenómeno está presente en las dos especies estudiadas. En *C. argentina* se manifiesta como 2 cuerpos con heteropicnosis positiva que corresponderían a los dos cromosomas sexuales. En *C. externa* se observó a cada cromosoma sexual con una configuración bipartita durante la profase temprana, originando 4 cuerpos, pero no se pudo determinar cuáles de ellos pertenecen al cromosoma X y cuáles al Y.

Es muy difícil la determinación taxonómica de las especies incluidas dentro de la familia Chrysopidae, en la que generalmente se utiliza la morfología de las genitalias como carácter distintivo. Quizás la citología podría constituir una herramienta útil para ayudar a una correcta determinación taxonómica de estos insectos, que cada vez cobran mayor importancia como controladores biológicos de un gran número de plagas agrícolas.

LITERATURA CITADA

Andrada, A. R., Gonzáles Olazo, E., Lozzia, M. E. y Heredia, F. 2009. Caracterización citogenética de *Chrysoperla argentina* González Olazo & Reguilón y *Chrysoperla externa* Hagen (Insecta, Neuroptera, Chrysopidae). Lilloa suplemento, 45: 95-96.

Andrada, A. R., González Olazo, E., Lozzia, M. E., Páez, V. y Heredia, F. 2011. Estudios meióticos en seis especies de Neuroptera (Insecta). Journal of Basic & Apllied Genetics, supplement, 41: 168-169.

Asana, J. J. y Kichijo, H. 1936. The chromosomes of six species of antlions (Neuroptera). Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Series VI, 5(2): 121-136.

Botto, E. N. 1999. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 58 (1-2): 58-64.

Cadena, P., Ángel, F., Gómez, L. A. y González, R. 2007. Diferenciación morfológica y molecular de especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae). Revista Colombiana de Entomología, 33(2): 171-177.

González-Olazo, E. V. y Reguilón, C. 1999. Chrysopidae (Neuroptera: Planipennia) asociados con cultivos cítricos en la provincia de Tucumán. XXII Congreso Argentino de Horticultura, Tucumán, 1999(2-4): A-184.

González Olazo E. V. y Reguilón, C. 2002. Una nueva especie de *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopi-

dae) para la Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 61 (1-2): 47-50.
Hermanson, L. y Freitas, S. 2004. Cromossomos mitóticos de duas espécies do genero *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). Genética & Evolução, XX Congresso Brasileiro de Entomologia.
Hirai, H. 1957. A Cytotaxonomic Study of the Chrysopidae (Neuroptera). Journal of Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Series VI, Zoology, 13: 219-223.
Hughes-Schrader, S. 1969. Distance segregation and compound sex chromosomes in mantispids (Neuroptera: Mantispidae). Chromosoma, 27: 109-129.
Hughes-Schrader, S. 1975. Segregational mechanisms of sex chromosomes in Spongilla-flies (Neuroptera: Sisyridae). Chromosoma, 52: 1-10.
Hughes-Schrader, S. 1983. Chromosomal segregational mechanisms in ant-lions (Myrmeleontidae, Neuroptera). Chromosoma, 88: 256-264.
Kichijo, H. 1934. The chromosomes of some neuropterous insects of the family Chrysopidae. Journal of Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Series VI, Zoology, 3: 55-65.
Kuznetsova, V. G., Grozeva, S. y Nokkala, S. 2004. New cytogenetic data on Nabidae (Heteroptera: Cimicomorpha), with a discussion of karyotype variation and meiotic patterns, and their taxonomic significance. European Journal of Entomology, 101: 205-210.
Lopes, A. T. y Freitas, S. 2011. Análise citogenética de duas espécies de crisopídeos do gênero *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae). II *Reunião* Brasileira de citogenética, CA016.
Lopes, A. T. y Freitas, S. 2012. Descrição do menor número diploide em Neuroptera: Chrysopidae. II Encontro Paulista de Citogenética, Resumo, p. 31.
Mola, L. M. 1995. Post-reductional meiosis in Aeshna (Aeshnidae, Odonata). Hereditas, 122: 47-55.
Morales, A. C. y Freitas, S. 2004. Haplotype characterization of the COI mitochondrial gene in *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) from different environments in Jaboticabal, state of São Paulo, southeastern Brazil. Brazilian Journal of Biology, 70(4): 1115-1121.
Niiyama, H. 1959. An XX-Y sex-mechanism in the male of a decapod Crustacea *Cervimunida princeps* Benedict. Bulletin Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 10(2): 106-112.
Nokkala, S. 1986a. The meiotic behaviour of B-chromosomes and their effect on the segregation of sex chromosomes in males of *Hemerobius marginatus* L. (Hemrobidae, Neuroptera). Hereditas, 105: 221-227.
Nokkala, S. 1986b. The nonsignificance of distance pairing for the regular segregation of the sex chromosomes in *Hemerobius marginatus* male (Hemerobidae, Neuroptera). Hereditas, 105: 135-139.
Nokkala, S. 1986c. The mechanisms behind the regular segregation of the m-chromosomes in *Coreus marginatus* L. (Coreidae, Hemiptera). Hereditas, 105: 73-85.
Nokkala, S y Grozeva, S. 2000. Achiasmatic male meiosis in Myrmedobia coleoptrata (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae. Caryologia, 53(1): 5-8.
Nokkala S. y Nokkala, C. 1983. Achiasmatic male meiosis in two species of *Saldula* (Saldidae, Hemiptera). Hereditas, 99: 131-134.
Nokkala S. y Nokkala, C. 1986. Achiasmatic male meiosis of collochore type in the heteropteran family Miridae. Hereditas, 105: 193-197.
Nokkala, S. y Nokkala, C. 2004. Interaction of B chromosomes with A or B chromosomes in segregation in insects. Cytogenet Genome Research, 106: 394–397.
Nowacek, J. M. 2010. Fixation and tissue processing. En: G. L. Kumar y J. A. Kiernan (eds.), Education Guide, Special Stains and Hematoxylin and Eosin. Pathology, California, 2nd ed., 300 pp.
Oguma, K. y Asana, J. J. 1932. Additional data to our knowledge on the dragonfly chromosome, with a note on occurrence of X-Y chromosome in the ant-lion (Neuroptera). Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Series 4, 1(4): 133-142.
Ruíz de Bigliardo, G. E., Caro, M. S., Romero Sueldo, M. y Frías de Fernández, A. M. 2007. Análisis citogenético, genitales externos y distribución de *Ligocatinus spinatus* (Ortoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). Acta Zoológica Lilloana, 51(2): 127-136.
Ruíz de Bigliardo, G. E., Virla, G., Caro, S. y Murillo Dasso, S. 2011. Karyotype and male pre-reductional meiosis of the sharpshooter *Tapajosa rubromarginata* (Hemiptera: Cicadelledae). Revista de Biología Tropical, 59(1): 309-314.
Séméria, Y. 1984. Some karyotypes in Chrysopidae. En: Biology of Chrysopidae. Series entomologica, Vol. 27, 294 pp.
Valencia-Luna, L. A., Romero-Nápoles, J., Valdéz-Carrasco, J., Carrillo-Sánchez, J. L. y López-Martines, V. 2006. Taxonomía y registro de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. Acta Zoologica Mexicana (n.s.), 22(1): 17-61.
Virkki, N. y Santiago-Blay, J. A. 1993. Trends of karyotype evolution in neotropical Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). Hereditas, 119: 263-283.